

Practitioner's Docket No.: 791_167

PATENT



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the application of: Toshikazu HIROTA, Takao OHNISHI

Filed: Concurrently herewith

For: MICROPIPETTE, DISPENSER AND METHOD FOR PRODUCING BIOCHIP

Box Patent Application
Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

I hereby certify that this paper or fee is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 addressed to the Box Patent Application, Assistant Commissioner for Patents, Washington D.C. 20231 on October 15, 2001 under "EXPRESS MAIL" mailing label number EV 002151309 US.

Gina M. Husak

CLAIM FOR PRIORITY

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested for the above-identified application and the priority provided in 35 USC 119 is hereby claimed:

Japanese Application 2000-315643 filed October 16, 2000.

In support of this claim, a certified copy of the Japanese Application is enclosed herewith.

Respectfully submitted,

October 15, 2001
Date

Stephen P. Burr
Reg. No. 32,970

SPB/gmh

BURR & BROWN
P.O. Box 7068
Syracuse, NY 13261-7068

Customer No.: 025191
Telephone:(315) 233-8300
Facsimile:(315) 233-8320

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年10月16日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-315643

出 願 人

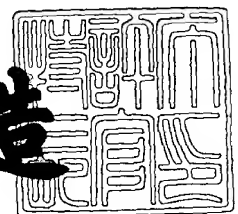
Applicant(s):

日本碍子株式会社

2001年 9月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3085421

【書類名】 特許願

【整理番号】 WP03399

【提出日】 平成12年10月16日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 B01L 3/02

【発明の名称】 マイクロピペット、分注装置及びバイオチップの製造方法

【請求項の数】 22

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号 日本碍子株式会社内

 【氏名】 廣田 寿一

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号 日本碍子株式会社内

 【氏名】 大西 孝生

【特許出願人】

 【識別番号】 000004064

 【氏名又は名称】 日本碍子株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100088616

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 渡邊 一平

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 009689

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

特 2 0 0 0 - 3 1 5 6 4 3

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9001231

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 マイクロピペット、分注装置及びバイオチップの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ピペット本体に、ピペット本体の外部から試料を注入する試料注入口と、注入された試料を導入しかつ一時貯留し得るキャビティと、貯留された試料をノズル部の貫通孔を経由して外部に吐出する試料吐出口とを形成してなるとともに、ピペット本体のキャビティ形成位置に対応した部位の外面上に圧電／電歪素子を設けてなり、圧電／電歪素子の駆動によりキャビティ内の体積を変化させ、キャビティ内に貯留された試料の一定量を試料吐出口から吐出させるマイクロピペットであって、

ノズル部における貫通孔の、軸方向に対して直角方向の断面形状が、中心から放射状に突き出た 3 個以上の突起を有するとともに、内角が鋭角と鈍角とを有する多角形状又は突起と突起とを曲線で結んだ王冠形状であり、また、その断面形状の面積（断面積）が、貫通孔の試料導入口端から試料排出口端まで、略相似形を保持しつつ連続的に漸減するように変化してなることを特徴とするマイクロピペット。

【請求項 2】 ピペット本体に、ピペット本体の外部から試料を注入する試料注入口と、注入された試料を導入しかつ一時貯留し得るキャビティと、貯留された試料をノズル部の貫通孔を経由して外部に吐出する試料吐出口とを形成してなるとともに、ピペット本体のキャビティ形成位置に対応した部位の外面上に圧電／電歪素子を設けてなり、圧電／電歪素子の駆動によりキャビティ内の体積を変化させ、キャビティ内に貯留された試料の一定量を試料吐出口から吐出させるマイクロピペットであって、

ノズル部における貫通孔の、軸方向に対して直角方向の断面形状が、貫通孔の試料導入口端から試料排出口端に向かって所定距離離れた第 1 の地点までは略円形で、かつ試料排出口端では中心から放射状に突き出た 3 個以上の突起を有するとともに、内角が鋭角と鈍角とを有する多角形状又は突起と突起とを曲線で結んだ王冠形状であり、また、その断面形状の面積（断面積）が、貫通孔の試料導入口端から第 1 の地点までは略円形を保持しつつ試料排出口端まで連続的に漸減す

るように変化してなることを特徴とするマイクロピペット。

【請求項 3】 前記突起を有する多角形状又は王冠形状の、隣接する突起の頂点と中心とを結んだ直線がなす角度が、1 度～1 2 0 度である請求項 1 又は 2 に記載のマイクロピペット。

【請求項 4】 前記突起を有する多角形状又は王冠形状の辺の合計長さが、これと同一面積の円の円周長さの 1. 1 倍以上である請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のマイクロピペット。

【請求項 5】 前記ノズル部における貫通孔の断面積の、連続的に漸減する変化率が、貫通孔の試料導入口端から試料排出口端に向かって所定距離離れた第 2 の地点までの変化率よりも、第 2 の地点から試料排出口端までの変化率の方が大きい請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のマイクロピペット。

【請求項 6】 前記ノズル部における貫通孔の内面の表面粗さが、貫通孔の試料導入口端が形成された面のそれよりも粗い請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のマイクロピペット。

【請求項 7】 前記ノズル部における貫通孔の試料排出口端近傍の表面が、撥液処理を施されてなる請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のマイクロピペット。

【請求項 8】 前記ピペット本体の、少なくともキャビティ形成位置及び圧電／電歪素子設定位置に対応した部位が、ジルコニアセラミックスからなる請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載のマイクロピペット。

【請求項 9】 前記ジルコニアセラミックスが、グリーンシート積層焼成法を用いて作製されたものである請求項 8 に記載のマイクロピペット。

【請求項 1 0】 前記ピペット本体の、試料吐出口を形成した部位が、樹脂からなる請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載のマイクロピペット。

【請求項 1 1】 前記圧電／電歪素子が、ジルコン酸鉛、チタン酸鉛及びマグネシウムニオブ酸鉛からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の鉛化合物を主成分として含有する圧電／電歪膜から構成された請求項 1 ～ 1 0 のいずれかに記載のマイクロピペット。

【請求項 1 2】 一つの前記ピペット本体に、複数の前記試料注入口と、複数の前記キャビティと、複数の前記試料吐出口とが形成されてなる請求項 1 ～ 1 1 の

いずれかに記載のマイクロピペット。

【請求項 1 3】 前記ピペット本体が、複数の第 1 のピペット部材及び一つの第 2 のピペット部材から構成され、前記第 1 のピペット部材には前記キャビティと前記圧電／電歪素子とが形成され、前記第 2 のピペット部材には複数の前記試料注入口と、複数の前記試料吐出口とが形成され、複数の前記第 1 のピペット部材と一つの前記第 2 のピペット部材とが互いに接合されてなる請求項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載のマイクロピペット。

【請求項 1 4】 前記ピペット本体が平板状物から構成されてなり、試料吐出口をこのピペット本体の側面又は主平面に形成してなる請求項 1 ～ 1 3 のいずれかに記載のマイクロピペット。

【請求項 1 5】 前記ピペット本体が平板状物から構成されてなり、前記試料吐出口をピペット本体の一方の主平面に、かつ、前記試料注入口を他方の主平面に形成してなる請求項 1 ～ 1 3 に記載のマイクロピペット。

【請求項 1 6】 複数の前記試料注入口を、一つの前記キャビティに接続してなる請求項 1 ～ 1 5 のいずれかに記載のマイクロピペット。

【請求項 1 7】 請求項 1 ～ 1 6 のいずれかに記載のマイクロピペットの複数、固定治具に固定したことを特徴とするマイクロピペット複合体。

【請求項 1 8】 請求項 1 ～ 1 6 のいずれかに記載のマイクロピペットを複数又は請求項 1 7 に記載のマイクロピペット複合体を一つ以上備えてなる分注装置であって、

前記ピペット本体に形成した試料吐出口を縦横に整列配置し、これらの試料吐出口からそれぞれ異種の液体試料を吐出させることを特徴とする分注装置。

【請求項 1 9】 前記試料注入口のそれぞれに、異種の液体試料を別個に充填した第 1 のカートリッジを備えてなり、試料吐出口から異種の試料を吐出させ得る請求項 1 8 に記載の分注装置。

【請求項 2 0】 前記試料注入口のそれぞれに、水性溶媒又は有機溶媒を充填した第 2 のカートリッジを備えてなり、前記ピペット本体に形成した試料注入口から試料吐出口までの連通空間を洗浄し得る請求項 1 8 又は 1 9 に記載の分注装置。

【請求項 2 1】 前記ピペット本体に形成した試料吐出口のそれぞれの外側に、試料吐出口の中心軸と共軸の開口を有する薄板からなる異方飛行滴遮蔽板を設けてなる請求項 1 8 ～ 2 0 のいずれかに記載の分注装置。

【請求項 2 2】 請求項 1 ～ 1 6 のいずれかに記載のマイクロピペット、請求項 1 7 に記載のマイクロピペット複合体、又は請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれかに記載の分注装置を用いたことを特徴とするバイオチップの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】 本発明は、マイクロピペット、分注装置及び DNA マイクロアレイ等のバイオチップの製造方法に関する。さらに詳しくは、所定の基板上に微小体積の液滴を高密度に整列固定する作業（微小スポットの形成作業）を伴う DNA マイクロアレイ等のバイオチップの製造等の分野で好適に用いられる、微小スポットの形成作業の高精細化が可能で、得られる製品品質の向上を図ることができるマイクロピペット、このマイクロピペットを用いた分注装置及び DNA マイクロアレイ等のバイオチップの製造方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】 近年における遺伝子構造の解析方法の進歩は目覚しく、ヒトの遺伝子を初めとして、多数の遺伝子構造が明らかにされてきている。このような遺伝子構造の解析には、顕微鏡スライドガラス等の基板上に数千から数万種類以上の異種の DNA 断片を微小スポットとして整列固定させた DNA マイクロアレイが用いられている。

【0 0 0 3】 この DNA マイクロアレイの製造における微小スポットの形成方法としては、QUILL 方式、ピン&リング方式、又はスプリングピン方式が広く用いられている。いずれの方法を採用した場合であっても、各微小スポットの容量と形状のばらつきを低く抑えて、微小スポット間の距離を一定に保ち、相互混入によるコンタミネーションを防止することが要求されるが、今後のさらなる高密度化に向けて、微小スポットの形成作業のさらなる高精細化、及び得られる製品品質のさらなる向上に対する要望が高まっている。

【0 0 0 4】

【発明が解決しようとする課題】 ここで、QUILL方式は、ピン先に形成した凹部に試料を貯め、ピン先を基板に接触させることで凹部内の試料を基板上に移して微小スポットを形成する方法であるが、ピン先が基板との接触によって変形したり損傷する等の耐久性の問題や、凹部に貯められた試料の洗浄が不完全となってクロスコンタミネーションを引起し易い等の問題がある。

【0005】 また、ピン&リング方式は、マイクロプレート中の試料溶液をリングでリザーブした後、溶液がリザーブされたリング内側を貫通するようにしてピン先でリング内の試料を捉え、基板上にスポットを形成していく方法であるが、1回にリザーブできる試料はリングの数に依存し、従来、その数は数種類程度であることから、数千種から数万種といった試料の微小スポットを形成するためには、数百から数千回程度の洗浄・乾燥工程もまた必要となり、生産性の面で問題がある。

【0006】 また、スプリングピン方式は、ピン先に付着した試料を、ピン先を基板に押付けることで基板上に移して微小スポットを形成する方法であり、スプリングを内蔵した二重ピン構造で、ピン、基板の損傷をやわらげ、試料を吹き出すものであるが、基本的には1回のリザーブで1回のスポッティングしかできず、やはり生産性に問題がある。

【0007】 これら従来の微小スポットの形成方法は、すべて試料溶液を大気中に曝した状態で基板上に運ぶため、運ぶ途中で試料が乾燥し、スポッティングが出来なくなるといった不具合が生じ、大変高価な試料溶液の使用効率が悪い等の問題がある。

【0008】 上述の微小スポットの形成方法が有する問題の解消を図る方法として、非接触式スポッティング法がある。この方法を用いた、生体試料を微量、精度よく分注する装置として、圧電／電歪素子をマイクロポンプとして使用したマイクロピペット及びこれを用いた分注装置が、開発、実用化されている。

この非接触式スポッティング法は、核酸やアミノ酸等を含んだ生体試料を微小な液滴として空中に吐出し、スライド基板上に付着させるものであり、上述のピン先が基板と接触する方法が有する問題等は解消される。

【0009】 しかしながら、この方法は、比較的粘度の高い生体試料の微小な

液滴を空中に吐出し、スライド基板上に付着させるものであるため、吐出時に、目的とする液滴（目的吐出滴）の他に、いわゆるサテライト（目的吐出滴より細かいしぶき状の滴）が発生し、それが基板上に付着して、本来のスポット形成位置以外の箇所にスポットを形成させたり、微小スポット間の距離を一定に保つことができずに、相互混入によるコンタミネーションを引き起こす等、得られる製品の品質上問題があった。このようないわゆるサテライトは、分注装置の運転初期には発生せずに、しばらく運転してから発生することもあり、工程管理上極めて厄介な問題であった。

【0010】 また、液滴の吐出速度が大きいと、スライド基板に付着する際に液滴の勢いが大きく、しぶき（飛沫）を発生させて、スポット周りにこの飛沫による不要スポット（これもサテライトと呼ぶ）を発生させる等の問題があった。このようないわゆるサテライトの発生を防止するためには、吐出速度を小さくすればよいが、吐出速度を小さくすると、吐出が不安定になるという問題があった。

【0011】 また、スポット形成の高密度化のためには、吐出方向を常に一定（まっすぐ）で安定化する必要がある。このため、吐出ノズルとスライド基板との間の距離を短くして吐出方向のバラツキを低減することは可能であるが、スライド基板そのものの厚さにバラツキがあることに加え、装置自体の機械的精度を高めるためにはコストの上昇を避けることができないという問題があった。

【0012】 また、例えば、DNA等を含んだ生体試料は、粘度が高いものが多く、吐出して付着後は、スライド基板上でスポットが広がらないように速やかに乾燥する特性が要求される。このような試料を用いた場合には、吐出ノズル部分で乾燥したり、増粘し易いため、ノズルが詰まって吐出不能になり易いという問題があった。

【0013】 一方、プリンタに用いられるインクジェット方式を転用してスポットティングする方法も検討されている。例えば、インクを噴出するノズルの孔を、少なくとも1つの角部を有する形状に構成し、この角部の毛管力を利用したインクジェット記録用ヘッド（特開昭59-178258号公報）が開示されている。

しかし、この公報に開示されたヘッドは、ノズルへの気泡の侵入を防止することについては一定の効果を発揮するものの、上述のような、いわゆるサテライトの発生防止等の問題については必ずしも十分に満足し得るものではなかった。

【0014】 また、試料吐出口の形状を、対称性を有する $2n$ 角形（ n は3以上）とし、また、インク路をインク吐出方向と直交する方向の断面形状を台形形状としたインクジェットヘッド（特開平3-101960号公報）が開示されている。

しかし、この公報に開示されたヘッドも、記録の際に必要なインク液滴の量や吐出速度が安定して得られることについては一定の効果を発揮するものの、上述のような、いわゆるサテライトの発生防止等の問題については必ずしも十分に満足し得るものではなかった。

【0015】 さらに、これらの公報に開示された発明の対象は、生体試料のスポット形成を主な対象とするものではないことから、これらの公報に開示されたものをそのまま転用するには困難な問題があった。すなわち、このようなインクジェット記録用ヘッドに、数千から数万といった試料を個別の流路で形成することは、サイズの、コスト的に課題が多く、さらにインクジェット方式は、スポッティング前にそのポンプ内に予め試料を気泡を含むことなく充填する必要がある、そのため、大量のパージ用試料が必要となり、試料の使用効率が極めて劣る等の問題があった。また、一般的には、ポンプ室を含む流路中は高速に液体が移動する方が気泡抜けには都合がよいが、生体試料、例えば、デリケートなDNA溶液を用いる場合は、試料が流路中で攪拌されることとなり、DNAが損傷する等の問題があった。

【0016】 本発明は、上述の問題に鑑みてなされたものであり、所定の基板上に微小体積の液滴を高密度に整列固定する作業（微小スポットの形成作業）を伴うDNAマイクロアレイ等のバイオチップの製造等の分野で好適に用いられる、微小スポットの形成作業の高精細化が可能で、得られる製品品質の向上を図ることができるマイクロピペット、このマイクロピペットを用いた分注装置及びバイオチップの製造方法を提供することを目的とする。

【0017】

【課題を解決するための手段】 上記目的を達成するため本発明によれば、下記のマイクロピペット、このマイクロピペットを用いた分注装置及びバイオチップの製造方法が提供される。

【0018】

[1] ピペット本体に、ピペット本体の外部から試料を注入する試料注入口と、注入された試料を導入しかつ一時貯留し得るキャビティと、貯留された試料をノズル部の貫通孔を経由して外部に吐出する試料吐出口とを形成してなるとともに、ピペット本体のキャビティ形成位置に対応した部位の外面上に圧電／電歪素子を設けてなり、圧電／電歪素子の駆動によりキャビティ内の体積を変化させ、キャビティ内に貯留された試料の一定量を試料吐出口から吐出させるマイクロピペットであって、ノズル部における貫通孔の、軸方向に対して直角方向の断面形状が、中心から放射状に突き出た3個以上の突起を有するとともに、内角が鋭角と鈍角とを有する多角形状又は突起と突起とを曲線で結んだ王冠形状であり、また、その断面形状の面積（断面積）が、貫通孔の試料導入口端から試料排出口端まで、略相似形を保持しつつ連続的に漸減するように変化してなることを特徴とするマイクロピペット。

【0019】

[2] ピペット本体に、ピペット本体の外部から試料を注入する試料注入口と、注入された試料を導入しかつ一時貯留し得るキャビティと、貯留された試料をノズル部の貫通孔を経由して外部に吐出する試料吐出口とを形成してなるとともに、ピペット本体のキャビティ形成位置に対応した部位の外面上に圧電／電歪素子を設けてなり、圧電／電歪素子の駆動によりキャビティ内の体積を変化させ、キャビティ内に貯留された試料の一定量を試料吐出口から吐出させるマイクロピペットであって、ノズル部における貫通孔の、軸方向に対して直角方向の断面形状が、貫通孔の試料導入口端から試料排出口端に向かって所定距離離れた第1の地点までは略円形で、かつ試料排出口端では中心から放射状に突き出た3個以上の突起を有するとともに、内角が鋭角と鈍角とを有する多角形状又は突起と突起とを曲線で結んだ王冠形状であり、また、その断面形状の面積（断面積）が、貫通孔の試料導入口端から第1の地点までは略円形を保持しつつ試料排出口端まで

連続的に漸減するように変化してなることを特徴とするマイクロピペット。

【0020】

〔3〕 前記突起を有する多角形状又は王冠形状の、隣接する突起の頂点と中心とを結んだ直線がなす角度が、1度～120度である前記〔1〕又は〔2〕に記載のマイクロピペット。

【0021】

〔4〕 前記突起を有する多角形状又は王冠形状の辺の合計長さが、これと同一面積の円の円周長さの1.1倍以上である前記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のマイクロピペット。

【0022】

〔5〕 前記ノズル部における貫通孔の断面積の、連続的に漸減する変化率が、貫通孔の試料導入口端から試料排出口端に向かって所定距離離れた第2の地点までの変化率よりも、第2の地点から試料排出口端までの変化率の方が大きい前記〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のマイクロピペット。

【0023】

〔6〕 前記ノズル部における貫通孔の内面の表面粗さが、貫通孔の試料導入口端が形成された面のそれよりも粗い前記〔1〕～〔5〕のいずれかに記載のマイクロピペット。

【0024】

〔7〕 前記ノズル部における貫通孔の試料排出口端近傍の表面が、撥液処理を施されてなる前記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載のマイクロピペット。

【0025】

〔8〕 前記ピペット本体の、少なくともキャビティ形成位置及び圧電／電歪素子設定位置に対応した部位が、ジルコニアセラミックスからなる前記〔1〕～〔7〕のいずれかに記載のマイクロピペット。

【0026】

〔9〕 前記ジルコニアセラミックスが、グリーンシート積層焼成法を用いて作製されたものである前記〔8〕に記載のマイクロピペット。

【0027】

〔10〕 前記ピペット本体の、試料吐出口を形成した部位が、樹脂からなる前記〔1〕～〔9〕のいずれかに記載のマイクロピペット。

【0028】

〔11〕 前記圧電／電歪素子が、ジルコン酸鉛、チタン酸鉛及びマグネシウムニオブ酸鉛からなる群から選ばれる少なくとも1種の鉛化合物を主成分として含有する圧電／電歪膜から構成された前記〔1〕～〔10〕のいずれかに記載のマイクロピペット。

【0029】

〔12〕 一つの前記ピペット本体に、複数の前記試料注入口と、複数の前記キャビティと、複数の前記試料吐出口とが形成されてなる前記〔1〕～〔11〕のいずれかに記載のマイクロピペット。

【0030】

〔13〕 前記ピペット本体が、複数の第1のピペット部材及び一つの第2のピペット部材から構成され、前記第1のピペット部材には前記キャビティと前記圧電／電歪素子とが形成され、前記第2のピペット部材には複数の前記試料注入口と、複数の前記試料吐出口とが形成され、複数の前記第1のピペット部材と一つの前記第2のピペット部材とが互いに接合されてなる前記〔1〕～〔11〕のいずれかに記載のマイクロピペット。

【0031】

〔14〕 前記ピペット本体が平板状物から構成されてなり、試料吐出口をこのピペット本体の側面又は主平面に形成してなる前記〔1〕～〔13〕のいずれかに記載のマイクロピペット。

【0032】

〔15〕 前記ピペット本体が平板状物から構成されてなり、前記試料吐出口をピペット本体の一方の主平面に、かつ、前記試料注入口を他方の主平面に形成してなる前記〔1〕～〔13〕に記載のマイクロピペット。

【0033】

〔16〕 複数の前記試料注入口を、一つの前記キャビティに接続してなる前記〔1〕～〔15〕のいずれかに記載のマイクロピペット。

【0034】

〔17〕 前記〔1〕～〔16〕のいずれかに記載のマイクロピペットの複数を、固定治具に固定したことを特徴とするマイクロピペット複合体。

【0035】

〔18〕 前記〔1〕～〔16〕のいずれかに記載のマイクロピペットを複数又は前記〔17〕に記載のマイクロピペット複合体を一つ以上備えてなる分注装置であって、前記ピペット本体に形成した試料吐出口を縦横に整列配置し、これらの試料吐出口からそれぞれ異種の液体試料を吐出させることを特徴とする分注装置。

【0036】

〔19〕 前記試料注入口のそれぞれに、異種の液体試料を別個に充填した第1のカートリッジを備えてなり、試料吐出口から異種の試料を吐出させ得る前記〔18〕に記載の分注装置。

【0037】

〔20〕 前記試料注入口のそれぞれに、水性溶媒又は有機溶媒を充填した第2のカートリッジを備えてなり、前記ピペット本体に形成した試料注入口から試料吐出口までの連通空間を洗浄し得る前記〔18〕又は〔19〕に記載の分注装置

【0038】

〔21〕 前記ピペット本体に形成した試料吐出口のそれぞれの外側に、試料吐出口の中心軸と共軸の開口を有する薄板からなる異方飛行滴遮蔽板を設けてなる前記〔18〕～〔20〕のいずれかに記載の分注装置。

【0039】

〔22〕 前記〔1〕～〔16〕のいずれかに記載のマイクロピペット、前記〔17〕に記載のマイクロピペット複合体、又は前記〔18〕～〔21〕のいずれかに記載の分注装置を用いたことを特徴とするバイオチップの製造方法。

【0040】

【発明の実施の形態】 以下、本発明の実施の形態を図面を参照しつつ具体的に説明する。

I. マイクロピペット

図 1 (a) に示すように、本発明のマイクロピペット 10 は、ピペット本体 1 に、ピペット本体 1 の外部から試料を注入する試料注入口 2 と、注入された試料を導入しかつ一時貯留し得るキャビティ 3 と、貯留された試料をノズル部 4 の貫通孔 5 を経由して外部に吐出する試料吐出口 6 とを形成してなるとともに、ピペット本体 1 のキャビティ 3 形成位置に対応した部位の外面上に圧電／電歪素子 7 を設けてなり、圧電／電歪素子 7 の駆動によりキャビティ 3 内の体積を変化させ、キャビティ 3 内に貯留された試料の一定量を試料吐出口 6 から吐出させるマイクロピペット 10 である。

【0041】 具体的には、ノズル部 4 は、一つ以上の貫通孔 5 からなる試料吐出口 6 が設けられた薄肉平板状のノズルプレート 11 を PET 樹脂シートで形成することができる。なお、ノズル部 4 (貫通孔 5) は、通常、金型等の打ち抜き等の機械加工によって形成してもよいが、その材質が PET、ポリイミド等の樹脂の場合は、レーザー (例えば、エキシマレーザー、高次 (3 次以上) の YAG レーザー) 加工を好適に用いることができる。貫通孔の軸方向に対して直角方向の断面形状の形成にはレーザーのビームを形状に沿って移動させる、いわゆるビームスキャン法又は予め断面形状の相似形状を形成したマスクをレーザー照射軸の途中にセットする、いわゆるマスク法を用いることができる。中でも、同時に多数の貫通孔が形成できるマスク法が好ましい。一方、ポンプ部 12 は、1 個以上の窓部 13 が形成されたスペーサプレート 14 と、スペーサプレート 14 の一方の側に重ね合わされて窓部 13 を覆蓋する閉塞プレート 15 とを、同じくそれぞれジルコニアセラミックスのグリーンシートで形成し、全体を積層し、一体焼成して、ピペット本体 1 が構成されている。なお、閉塞プレート 15 には試料注入口 2 が設けられ、スペーサプレート 14 に形成されている窓部 13 に連結する導入孔 16、連通路 17 へとつながっている。そして、閉塞プレート 15 の外面上には、下部電極 20、圧電／電歪膜 19 及び上部電極 18 からなる圧電／電歪素子 7 が形成されたものを挙げることができる。

【0042】 上記のような構成のマイクロピペットによれば、上部電極 18 と下部電極 20 との間に電界が生じると、圧電／電歪素子 7 が変形し、窓部 13 が

覆蓋されて形成されたキャビティ（加圧室）3の容積が減少することにより、キャビティ3内に充填された試料（DNA断片等を含む液体）がキャビティ3に連通する試料吐出口6から所定速度で吐出され、顕微鏡スライドガラス等の基板上の微小スポットとして整列固定させたDNAマイクロアレイ等のバイオチップを作製することができる。なお、図1（a）、（b）に示すような、いわゆるインクジェット方式の装置構造は、例えば、特開平6-40030号公報に記載されている。

【0043】 上記した構成のマイクロピペットにおいては、キャビティ（加圧室）3内において、DNA断片等を含む液体試料が層流で移動するような形状、流路寸法に形成されていることが好ましい。

【0044】 具体的なキャビティの一例を、図1（c）に従って説明する。キャビティ3の形状は、図1（c）に示すように長尺形状でその一端に試料を導入する試料注入口2又は導入孔22があり、他端に試料吐出口6が連結されている。このような形状にすることにより、キャビティ3を試料注入口2から試料吐出口6に至る流路の一部として、試料注入口2から、又は試料注入口2から連通路21、導入孔22を経てキャビティ3内に移動する試料の流れを乱すことなく試料吐出口6へ導くことができる。具体的なキャビティ3の寸法は、試料の種類、作成する液滴の大きさ、形成密度により異なるが、例えば、塩基対長1～100

00bpのDNA断片を $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で $\times 1\text{TE}$ 緩衝液（10mM Tris-HCl（pH8.0） 1mM EDTA）に分散させた試料を数百マイクロンピッチで数十～百数十マイクロン ϕ 液滴径のスポットティングが必要とされるDNAマイクロアレイ等のバイオチップの製造用マイクロピペットの場合は、キャビティ長（L）は、1～5mm、キャビティ幅（W）は、0.1～1mm、キャビティ深さ（D）は、0.1～0.5mmが好ましい。またキャビティ内壁には、流れを乱す突起物がないように滑らかであることがよく、その材質は、試料溶液と親和性のよいセラミックスからなることが好ましい。

【0045】 本発明を上述の構成とすることにより、圧電／電歪素子の一つ一つの駆動に対応して微量液体が試料吐出口より吐出され、その容積を微小かつバラツキのない一定のものとすることができる。駆動周期は、圧電／電歪素子を

用いることにより、高周波対応可能となり、吐出に要する時間も短縮することができる。また試料注入後吐出までの間、試料は閉空間内を移動するため、途中で乾燥することがない。さらには、ピペット本体全体を小さくコンパクトに形成することができるため、試料が移動する流路を短くすることができ、流路壁に試料が付着し使用効率を劣化させることを低減することができる。

【0046】 本発明のマイクロピペットにおいては、キャビティ内に予め緩衝液や生理食塩水等の置換液を充填し、次いで、試料を試料導入孔からキャビティ内に層流置換させながら注入した後、圧電／電歪素子を駆動させキャビティ内の試料を試料吐出口から吐出させてもよい。層流置換完了の終点は、試料の移動する速度、体積を予め求めておき、置換時間で制御してもよいが、キャビティ内の流体特性の変化を検知することにより把握することがさらに好ましい。なお、圧電／電歪素子を駆動させながら試料を試料導入孔からキャビティ内に層流置換させてもよい。予め安価な置換液によりキャビティ内を確実に置換後、高価な試料を層流置換することにより、吐出不良の発生が完全に防止でき、高価な試料を効率よく吐出できる。

さらに、本発明のマイクロピペットにおいては、キャビティ内に予め緩衝液や生理食塩水等の置換液を充填し、次いで、試料を試料導入孔からキャビティ内に置換させながら注入し、置換完了の終点を、キャビティ内の流体特性の変化を検知することにより把握した後、圧電／電歪素子を駆動させキャビティ内の試料を試料吐出口から吐出させることが好ましい。キャビティ内の流体特性の変化を検知することにより置換完了を把握することにより、流路内で試料と置換液が多少混合しても、その混合している部分と混合していない部分の区別が容易にかつ精度よくできるため、置換液と混合してパージしなければならない試料の量を少なくすることができ、試料の使用効率を上げることができる。

【0047】 また、キャビティ内の流体特性の変化は、圧電／電歪素子に振動を励起する電圧を印加し、その振動に伴う電気的定数の変化を検出することにより把握することが好ましい。このようにすることで、特別な検出素子等を設置する必要もなく、安価で、高精度な検出をすることができる。

【0048】 図2に示すように、本発明のマイクロピペットのノズル部におけ

る貫通孔 5 の軸方向に対して直角方向の断面形状の面積（断面積）は、貫通孔の試料導入口端 2 3 から試料排出口端 2 4 まで、略相似形を保持しつつ連続的に漸減するように変化するように構成されている。すなわち、試料導入口端 2 3 における断面積は、例えば、図 2 に示す B - B 線における断面積、及び C - C 線断面積を経由して、試料排出口端 2 4 における断面積まで連続的に漸減する。

このように構成することによって、試料導入口端 2 3 で乱れていた試料の流れ（試料の流速が同一断面内でばらついている）を、試料排出口端 2 4 に到達するまでに整流することができるため、吐出方向を安定化することができるとともに、試料排出口端 2 4 での試料の流速を効率的に高めることができ、吐出に際しての液滴の切れが向上するため、いわゆる、サテライトの発生も防止することができる。

【0 0 4 9】 図 3（a）、（b）及び図 4 に示すように、貫通孔の軸方向に対して直角方向の断面（例えば、図 2 の B - B 線断面）形状は、中心 O から放射状に突き出た 3 個以上の突起 8 を有するとともに内角が鋭角と鈍角とを有する多角形又は突起と突起とを曲線で結んだ王冠形状になるように構成されている。

このように構成することによって、試料排出口端 2 4 から外部に吐出された液滴は、吐出直後においては貫通孔 5 の形状に対応して突起を有する形状となった後、速やかにその表面張力で球状に収約するため、この表面張力の作用によってノズル部の貫通孔 5 から吐出された液滴の切れが向上する（迅速に一つの液滴となる）こととなり、液滴の後部で、液滴が細かく分離する、いわゆるサテライトの発生を防止することができる。

また、突起 8 により、試料の流れを整流することができるため、吐出方向を安定化することができる。

なお、上記吐出方向の安定性向上及びサテライトの発生防止に効果のある貫通孔 5 の断面積の漸減及び所定形状の設定は、それぞれ単独で行っても効果はあるが、同時に行うことによって、さらに顕著な効果を発揮することになる。

ところで、図 3（a）、（b）に示す多角形状又は王冠形状の突起部形状は、必ずしも図に示すような先鋭形状をなしている必要はなく、ノズル部の材質、加工法、加工機械の精度により、先端が鈍ったものであってもよい。

【0050】 図5(a)、(b)及び図6に示すように、本発明のマイクロピペットは、ノズル部における貫通孔5の、軸方向に対して直角方向の断面形状が、貫通孔5の試料導入口端23から試料排出口端24に向かって所定距離離れた第1の地点(図5ではD-D線で示す)までは略円形で、かつ第1の地点(D-D線)から試料排出口端24までは中心から放射状に突き出た3個以上の突起8を有するとともに、内角が鋭角と鈍角とを有する多角形状又は突起と突起とを曲線で結んだ王冠形状であり(図3(a)、(b)参照)、また、その断面形状の面積(断面積)が、貫通孔の試料導入口端23から第1の地点(D-D線)までは略円形を保持しつつ試料排出口端24まで連続的に漸減するように構成したものであってもよい。ここで、第1の地点の範囲としては、試料導入口端23と試料排出口端24との中間であって、試料導入口端23から試料排出口端24までの距離を1とした場合、試料導入口端23から、0.1~0.7のところが好ましい。0.1未満であると、試料導入口端23の断面形状(円形)を安定して形成できないことがある。また、0.7を超えると、突起形状の整流効果が不十分となることがある。

このように構成することによって、上述のように、試料排出口端24における突起形状に起因して、ノズル部の貫通孔から吐出された液滴の切れが向上する(迅速に1つの液滴となる)ため、液滴の後部で、液滴が細かく分離する、いわゆるサテライトの発生を防止することができる。また、試料導入口端23が略円形であることによって、キャビティからの圧力及び試料の流れが均一にノズル部に伝達されるとともに、第1の地点から試料排出口端24までの突起形状による整流効果によって、試料に吐出方向を安定化することができる。

【0051】 また、本発明のマイクロピペットにおいては、図3に示すように、突起8を有する多角形の、隣接する突起8の頂点(例えば、P、Q)と中心Oとを結んだ直線がなす角度 θ が、1度~120度であることが好ましく、3度~72度がさらに好ましい。この角度が1度未満であると、円形に近似してしまい、本発明の効果を十分に発揮することができないことがある。また、120度を超えると、試料の吐出方向が不安定になることがある。

【0052】 また、本発明のマイクロピペットにおいては、図3に示すように

、突起 8 を有する多角形状又は王冠形状の辺の合計長さ L_1 が、これと同一面積の円の円周長さ L_2 の 1. 1 倍以上 ($L_1 / L_2 \geq 1. 1$) であることが好ましく、1. 1 5 倍以上であることがさらに好ましい。1. 1 倍未満であると、円形に近似してしまい、いわゆるサテライトが発生することがあり、また、ノズル部の吐出口端 2 4 近傍で、試料が乾燥し、吐出不良や吐出曲がりを引き起こすことがある。

【0 0 5 3】 また、本発明のマイクロピペットにおいては、図 2 及び図 5 (a)、(b) に示すように、ノズル部における貫通孔 5 の断面積の、連続的に漸減する変化率が、貫通孔の試料導入口端 2 3 から試料排出口端 2 4 に向かって所定距離離れた第 2 の地点 (E-E 線及び F-F 線) までの変化率よりも、第 2 の地点 (E-E 線及び F-F 線) から試料排出口端 2 4 までの変化率のほうが大きくなるように構成することが好ましい。このように試料排出口端 2 4 に向かって 2 段に絞り込むことによって、試料を整流する効果をさらに向上させるとともに、試料排出口端 2 4 における試料流速向上の効率を高めることができる。ここで、第 2 の地点の範囲としては、試料導入口端 2 3 と試料排出口端 2 4 との間であって、試料導入口端 2 3 から試料排出口端 2 4 までの距離を 1 とした場合、試料導入口端 2 3 から、0. 3 ~ 0. 7 のところが好ましい。なお、第 2 の地点は、図 5 (b) に示すように、第 1 の地点と一致させることが、サテライトの発生防止及び整流効果の点で好ましく、また、試料導入口端 2 3 及び試料排出口端 2 4 を含んだ貫通孔の形成も容易となる。ノズル部材の材質が PET、ポリイミド等の樹脂の場合は、レーザー (例えば、エキシマレーザー、高次 (3 次以上) の YAG レーザー) 加工を好適に用いることができるが、このような漸減する比率が変化する場合は加工の途中でレーザーのパワーを変化させることで対応すればよい。すなわち、図 2、図 5 (a)、(b) に示すように試料導入口端 2 3 から第 2 の地点までの変化率が、第 2 の地点から試料排出口端 2 4 のそれより小さい場合は、レーザーの照射を試料導入口端 2 3 から行ない、加工の途中で、レーザーのパワーを減ずればよい。

【0 0 5 4】 なお、貫通孔の断面積を連続的に漸減させる場合の、貫通孔の軸方向の断面形状については、図 7 に示す紡錘形のような、その漸減率を試料排出

口端 2 4 に向かい連続的に増加させた形状であってもよく、その場合の加工法は、例えば、レーザー照射を試料導入口端 2 3 から行ない、そのパワーを連続的に減少させる方法が採られる。

【0 0 5 5】 また、本発明のマイクロピペットにおいては、図 1 に示すように、ノズル部における貫通孔 5 の内面の表面粗さが、貫通孔 5 の試料導入口端 2 3 が形成された面 3 8 のそれよりも粗く構成することが好ましい。貫通孔 5 の内面の表面粗さが、他の部位のそれよりも粗いことにより、試料を吐出し終わった後の貫通孔 5 内に残った試料の液面のゆれ（振動）が速やかに減衰・収束するため、液面が残存することによるサテライトの発生を防止することができる。

【0 0 5 6】 また、本発明のマイクロピペットにおいては、ノズル部における貫通孔の試料排出口端近傍の表面に、撥液処理を施した構成とすることが好ましい。貫通孔の試料排出口端近傍の表面の撥水性を高めることと、他の構成との相乗効果によって、液滴の切れをさらに向上させることができる。

【0 0 5 7】 また、本発明のマイクロピペットにおいては、ピペット本体の、少なくともキャビティ形成位置及び圧電／電歪素子設定位置に対応した部位が、ジルコニアセラミックスからなるように構成することが好ましく、ピペット本体の全ての部位をジルコニアセラミックスからなるように構成することがさらに好ましい。この場合、ジルコニアセラミックスは、グリーンシート積層焼成法を用いて作製されたものであることが好ましい。ジルコニア、中でも、安定化ジルコニアと部分安定化ジルコニアは、薄板状としても機械的強度が大きいこと、靱性が高いこと、酸／アルカリ溶液に耐久性があること、及び圧電膜や電極材との反応性が小さいこと等から、本発明に用いられるピペット本体の材質として優れている。

【0 0 5 8】 また、ピペット本体の、試料吐出口を形成した部位を、成形性及びコストの面から、樹脂からなるように構成してもよい。

【0 0 5 9】 また、本発明に用いられる圧電／電歪素子を、ジルコン酸鉛、チタン酸鉛及びマグネシウムニオブ酸鉛からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の鉛化合物を主成分として含有する圧電／電歪膜から構成することが好ましい。すなわち、このような圧電／電歪膜は、高い電機機械結合係数と圧電定数とを有し

、圧電膜の焼結時におけるピペット本体（ジルコニアセラミックス）との反応性が小さく、安定した組成のものが得られる点から好ましい。

【0060】 また、本発明のマイクロピペットにおいては、図8に示すように、1個のピペット本体1内に、試料注入口2、キャビティ3、試料吐出口6、及び圧電／電歪素子7を、それぞれ複数箇所形成し、それぞれの圧電／電歪素子7の上部電極18と下部電極20が一括して引き出したものであってもよい。このように構成することによって、全体がコンパクトでかつ試料吐出口を精度よく、高密度に配置することが可能になり、異種の試料を同時に吐出することができるため、DNAマイクロアレイ等のバイオチップを効率的に生産性よく作製することができる。

【0061】 また、本発明のマイクロピペットは、キャビティ及び圧電／電歪素子を形成した一つ以上の第1のピペット部材と、試料注入口及び試料吐出口のうちの少なくともいずれか一方の一つ以上を形成した一つ以上の第2のピペット部材とを接合して得られる、一つ以上の接合体を固定一体化してなるものであってもよい。具体的には、図12に示すように、キャビティ3と圧電／電歪素子7及び導入孔35がそれぞれ一個ずつ形成された第1のピペット部材1cと、試料注入口2と2個所の連通路36がそれぞれ一個ずつ形成された第2のピペット部材1aと、試料吐出口6が複数個形成された第2のピペット部材1bを別個に作成した後、互いに接着材37により接合一体化したものを挙げることができる。

それぞれの材質としては、例えば、第1のピペット部材1cは、部分安定化ジルコニア、第2のピペット部材1aは部分安定化ジルコニア、第2のピペット部材1bはPET樹脂からなるものを挙げるすることができる。互いの接合は、機械的に行ってもよいが、接着材や熱拡散等による接合が、流路のシール性を保つ点から好ましい。

このように構成することによって、ピペット本体の材料選択の範囲を広げ、各部位に最適な材料を選ぶことが可能となる一方、素子の歩留まりの向上、試料吐出口の高精度、高密度配列、複数種試料同時吐出が同時に可能になる。

【0062】 図9（a）、（b）に示すように、本発明のマイクロピペットは、いわゆるエッジタイプと呼ばれるものであってもよい。すなわち、1個のピペ

ット本体 1 内に、試料注入口 2、キャビティ 3、試料吐出口 6、及び圧電／電歪素子 7 を、それぞれ複数箇所形成している。そして、このマイクロピペットでは、試料吐出口 6 がピペット本体 1 の側面に形成されており、通常のピペット 2 5 から試料注入口 2 に注入された試料は、ピペット本体 1 内の連通路 2 6 を通ってキャビティ 3 内に流入・充填しており、圧電／電歪素子 7 の駆動によってキャビティ 3 内の体積を変化させて、キャビティ 3 内に充填されている試料の一定量を試料吐出口 6 から吐出させる。試料吐出口 6 がピペット本体 1 の側面に形成されていると、平板状のピペット本体 1 を縦に並べて、試料吐出口 6 の密度を容易に上げることができる。

【0063】 また、図 10 (a)、(b) に示すように、本発明のマイクロピペットは、図 8 (a)、(b)、図 11 (a) ～ (d) 及び図 12 (a)、(b) と同様に、いわゆるフェースタイプと呼ばれるものであり、図 9 (a)、(b) と同じく、1 個のピペット本体 4 0 内に、試料注入口 2、キャビティ 3、試料吐出口 6、及び圧電／電歪素子 7 を、それぞれ複数箇所形成したものであってもよい。そして、このマイクロピペットでは、試料吐出口 6 がピペット本体 1 の主平面に形成されている。キャビティ 3 と試料注入口 2 との間は、導入孔 2 7 及び連通路 2 8 でつながっている。そして、試料注入口 2 が他方の主平面に形成されている。このような構成では、エッジタイプに比べ吐出口の形成が容易で精度よく行えるとともに、試料吐出口 6 がピペット本体 1 の主平面に形成されていると、試料吐出口 6 を形成した平板と平行して基板をセットできることが可能になり、液滴の吐出距離を一定にすることが容易になり、液滴の形状を安定化させることができる。また、ピペット本体 1 の異なる主平面にそれぞれ試料注入口 2 と試料吐出口 6 を形成することにより、試料注入口 2 から、試料吐出口 6 までの流路の長さが殆ど平板の厚さ距離だけで済み、試料液体の流路パスが短く、単純なものとなって、流路途中で気泡がひっかかり、吐出不良を起こす等の不具合を低減することができ、さらに試料の使用効率を向上させることができる。

【0064】 また、本発明のマイクロピペットは、ピペット本体を平板状物から構成してなり、試料吐出口をこのピペット本体の側面又は主平面に形成してなるものであるが、このように構成する（ピペット本体を平板状にする）ことによ

って、ピペット本体の製造が、後述するようなグリーンシート等の積層で行うことができ、また、全体を薄くコンパクトにすることができる。さらに、図 1 3 に示すように、ピペット本体 1 を平板状とし、試料吐出口 6 をピペット本体 1 の一方の主平面に形成し、試料注入口 2 を他方の主平面に形成し、圧電／電歪素子 7 を、試料吐出口 6 と同じ主平面内に形成してもよい。この場合、試料注入口 2 を形成した面には試料注入口 2 以外のものは形成していないため、試料の注入が行い易いという利点を有する。

【0 0 6 5】 また、本発明のマイクロピペットは、前述のマイクロピペット（ユニット）の複数を、固定治具に固定したマイクロピペット複合体としたものであってもよい。

例えば、図 1 1 に示すように、1 個のピペット本体 1 内に、試料注入口 2、キャビティ 3、試料吐出口 6、及び圧電／電歪素子 7 を、それぞれ 1 個形成したユニット（図 1 1（c）、（d）参照）を複数個、固定治具 2 9（後述の押さえ治具 3 0、位置決めピン 3 1 及び固定板 3 2 の総称）に固定した例を示している。各ユニットは、試料注入口 2 へ試料を供給するチューブ（連通路） 3 3 を保持する押さえ治具 3 0 と位置決めピン 3 1 で固定板 3 2 に固定されている。なお、図 1 1（a）、（b）では、固定を押さえ治具 3 0 の両端をネジ 3 4 で固定板 3 2 に締め付けることで行っているが、固定法は、ネジ、バネ等で機械的に行う他、
接着材等で行ってよい。

このように構成することによって、ピペット本体 1 個 1 個の製造が容易になり、歩留まりを向上させることができる。

【0 0 6 6】 また、本発明のマイクロピペット複合体は、複数の試料注入口を、1 のキャビティに接続してなるものであってもよい。具体的には、図 1 4 に示すように、2 個の試料注入口 2 が、1 個のキャビティ 3 に接続されている一例を挙げることができる。この例では、圧電／電歪素子 7 は、試料注入口 2 と同じ主平面内に形成され、試料吐出口 6 は、他方の主平面に形成されたものを挙げることができる。

このように構成することによって、複数個の試料注入口より試料又は置換液をタイミングを調整して、吸引、押し出すことにより、キャビティ内を確実に充填

することができる。

【0067】

I I. 分注装置

本発明の分注装置は、前記マイクロピペットを複数又は前記マイクロピペット複合体を1以上備えてなり、ピペット本体に形成した試料吐出口を縦横に整列配置し、これらの試料吐出口からそれぞれ異種の液体試料を吐出させることを特徴とする。

このように構成することによって、一度に数多くの種類の試料を同時に供給でき、また、一部に不良の生じたピペットを容易に交換することができる。さらに、試料吐出口が縦横に整列配置されていることにより、例えば、DNAマイクロアレイ等のバイオチップのように二次元的に整列固定された微小スポットが必要な場合に好適に適用することができる。

【0068】 具体的には、図15に示すように、本発明の分注装置55は、図16(a)、(b)に示す試料注入口52、試料吐出口51を有するマイクロピペット50の複数個(50a、50b、50c)を試料吐出口を下方向に向けた状態で立設させて構成したものを挙げることができる。すなわち、各マイクロピペット50a、50b、50cは、それぞれの試料注入口52a、52b、52cを上側とし、試料吐出口51a、51b、51cを下側とし、かつこの試料吐出口51a、51b、51cが縦横に整列配置されて、試料吐出口51a、51b、51cからそれぞれ異種の液体試料を吐出させるようになっている。また、ピペット本体に形成した試料吐出口51a、51b、51cのそれぞれの外側に、試料吐出口の中心軸と共軸の開口を有する薄板からなる異方飛行滴遮蔽板53を備えてなる構成としてもよい。異方飛行滴遮蔽板53を備えてなる構成とすることによって、万一吐出液滴の吐出方向が曲がってしまった場合であっても、基板に液滴が到達することがなく、スポッティングの位置ずれや、隣のスポットと混じりあう不良を防止することができる。

【0069】 このような構成を有する分注装置55においては、図17に示すように、試料注入口52a、52b、52cのそれぞれに、異種の液体試料を別個に充填した第1のカートリッジ60を備えてなり、試料吐出口51a、51b

、51cから異種の液体試料を吐出させ得る構成としたものが、試料の使用効率を高めることができる点で好ましい。

【0070】 また、試料注入口のそれぞれに、水性溶媒（例えば、生理食塩水）又は有機溶媒を充填した第2のカートリッジを備えてなり、ピペット本体に形成した試料注入口から試料吐出口までの連通空間を洗浄し得る構成としたものが、数千から数万種類という多種類のDNA断片等を汚染なく、しかも純度よく微小スポットに吐出することができる点から好ましい。なお、カートリッジから試料注入口のそれぞれに試料等を注入する方法は、カートリッジを試料注入口にセットした後、針等でカートリッジの底を開封する方法の他、予め、試料注入口近傍に針等を形成し、セットと同時に開封されるようにしてもよい。また、開封後気体等を圧送し、試料等を強制的に押し出す機構を加えてもよい。

【0071】

III. バイオチップの製造方法

本発明のDNAマイクロアレイ等のバイオチップの製造方法は、前記分注装置を用いたことを特徴とする。

一般に、DNAマイクロアレイにスポットされるDNA断片を含んだ試料は、図17に示す第1のカートリッジ60中でそのDNA断片を増幅して用いられるが、ピペット本体中に、ある程度の空間を有する本発明のマイクロピペットを用いた本発明の分注装置を用いた場合には、マイクロピペット内で増幅を行ってもよい。

【0072】 本発明のバイオチップの製造方法としては、例えば、DNAマイクロアレイの場合、下記の方法を挙げることができる。

第1のカートリッジ60中でそのDNA断片を増幅して用いる場合は、予め置換液である緩衝液の入ったカートリッジをセット後、各マイクロピペット内のキャビティに緩衝液を充填し、さらに試料注入口に、DNA断片試料の入ったカートリッジをセットし、針等でカートリッジの底を開封、試料注入口に試料を注入する。その後圧電／電歪素子を駆動させ試料吐出口より予め充填した緩衝液を吐出しながら、キャビティ内を試料で層流置換する。

置換の終了点は、吐出した緩衝液の容量によって判断してもよいが、リレー切

り替えにより、圧電／電歪素子をキャビティ内の液体の粘度、比重を検出するセンサとして作用させる方法で感知する。置換の終了後は、求められるスポット径に応じた液滴量に対応した圧電／電歪素子の駆動条件にて駆動し、スポットティングを繰り返すことによりDNAマイクロアレイを製造する。通常一つのスポットを形成するのに、マイクロピペットから一〜数百滴を吐出して行う。なお、試料注入口中の試料の量が減少したら、緩衝液を追加し、流路中に気泡が入らないようにし、吐出を続けることにより、試料をマイクロピペット内に残すことなく使い切ることができる。試料から置換液への置換の完了（試料吐出の終了）は、同じく、圧電／電歪素子を用いた液体の粘度、比重の検出で行う。また、予め濃度を薄めた試料溶液を用い、基板上に微小滴を形成しながら、溶媒を乾燥させていく方法も好適である。このような方法で行うことにより、より流路中に残存する試料の量を低減することができ、試料の使用効率を向上させることができる。

さらに、使用する置換液及び試料は、予め脱気操作を通して溶液中の溶存気体を取り除いたものを用いることが好ましい。このような溶液を用いることにより、流路内に溶液を充填する際に、流路途中に気泡が引っかかり充填が不備になる場合であっても、その気泡を溶液中に溶かし込んで不具合を回避することができる。とともに、吐出の途中に流体中に気泡が発生し、吐出に関する不具合の発生を防止することができる。

【 0 0 7 3 】

【実施例】 以下、本発明を実施例によってさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によっていかなる制限を受けるものではない。

図4に示す実施例は、ノズル部材として厚さ $38\mu\text{m}$ のPET樹脂からなるシートを、加工法としてエキシマレーザーを用いて貫通孔を加工した。貫通孔の軸方向に対して直角方向の断面形状の形成には、予め断面形状の相似形状を形成したマスクをレーザー照射軸の途中にセットする、いわゆるマスク法を用いた。レーザーの照射は貫通孔の試料導入口端23側から排出口端24側方向に行ない、貫通孔の試料導入口端23での形状が、図3(a)に示すように、突起形状の内接円直径 $L4$ が $75\mu\text{m}$ 、隣接する突起の頂点と中心とを結んだ直線がなす角度 θ が15度、突起部8の直線距離 $L3$ が $13\mu\text{m}$ となるようにマスクを設計した

。貫通孔の軸方向に対して平行方向の断面形状が試料排出口端に向かって先細りのテーパ形状をなすように形成するため、マスク法を用いた上でレーザーのパワーを調整した。すなわち、レーザーのパワーを、レーザーの照射によって数秒で貫通孔が形成される値 ($30 \text{ mJ} / \text{sec}$) に比べ低い値とし、時間をかけ加工した。具体的には、レーザーパワーを $20 \text{ mJ} / \text{sec}$ とし、 20 sec かけて貫通孔が形成できるように調整することによりテーパ形状を形成した。そして、貫通孔の試料排出口端 24 での形状を、図 3 (a) に示すように、突起形状の内接円直径 L_4 が $50 \mu\text{m}$ 、隣接する突起の頂点と中心とを結んだ直線がなす角度 θ が 15 度、突起部の直線距離 L_3 が $8 \mu\text{m}$ となるようにした。

また、図 6 に示す実施例の場合は、同様の装置において、円形のマスクを用いマスク法にて作成した。その際のレーザーパワーは、上記条件より低くとることにより、試料導入口端 23 では、略円形、試料排出口端 24 では突起を有する形状とした。具体的には、レーザーパワー 10 mJ 、照射時間 20 sec とすることで、貫通孔の試料導入口端 23 では直径が $80 \mu\text{m}$ の円形、試料排出口端 24 では、図 3 (a) に示すように、突起形状の内接円直径 L_4 が $50 \mu\text{m}$ 、隣接する突起の頂点と中心とを結んだ直線がなす角度 θ が 15 度、突起部 8 の直線距離 L_3 が $8 \mu\text{m}$ となるようにした。

図 4、6 に示す貫通孔を有するノズル部を用いたマイクロピペットにて、塩基対長 1000 bp の DNA 断片を $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ の濃度で $\times 1 \text{ TE}$ バッファー（緩衝液）に溶解した試料を連続して吐出させた場合、十万回吐出させてもいわゆるサテライトは発生しなかった。また、一連の吐出作業の途中でノズルが乾燥し吐出不能になることもなく、その良好な吐出性能は、吐出間隔を 10 秒以上に広げても変わらなかった。

また、吐出速度が早すぎて、スライド基板に付着する際に液滴の勢いが大きく、しぶきを発生することを防ぐため、圧電／電歪素子の変形速度を低減し、液滴の吐出速度を低減し、従来の $1/2$ 以下 ($4 \text{ m} / \text{sec}$ 以下) にした場合においても、サテライトが発生することが無く、また、吐出方向が曲がる等の吐出不安定化は生じなかった。

【0074】

【発明の効果】 以上説明したように、本発明によって、所定の基板上に微小体積の液滴を高密度に整列固定する作業（微小スポットの形成作業）を伴うDNAマイクロアレイの製造等の分野で好適に用いられる、微小スポットの形成作業の高精細化が可能で、得られる製品品質の向上を図ることができるマイクロピペット、このマイクロピペットを用いた分注装置及びバイオチップの製造方法を提供することができる。従って、このようなマイクロピペットを用いた分注装置及びこのよう分注装置を用いたバイオチップの製造方法によって、1回に数百から数万の異種の試料を効率よく分注して微小スポットを形成することが可能となり、バイオチップの製造等の生産性を飛躍的に向上させることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のマイクロピペットの一の実施の形態を模式的に示し、(a)は全体断面図で、(b)その詳細図、(c)はキャビティ部分の斜視図である。

【図2】 図1(a)のA部拡大図である。

【図3】 図2のB-B線断面図で、本発明のマイクロピペットのノズル部における貫通孔の、軸方向に対して直角方向の断面形状を模式的に示す説明図で、(a)は多角形状の場合、(b)は王冠形状の場合をそれぞれ示す。

【図4】 本発明のマイクロピペットの一の実施の形態（一の実施例）におけるノズル部における貫通孔の突起の状態を模式的に示す斜視図である。

【図5】 本発明のマイクロピペットの他の実施の形態におけるノズル部における貫通孔の形状を模式的に示す断面図で、(a)は第1の地点と第2の地点とが異なる場合、(b)は第1の地点と第2の地点とを一致させた場合をそれぞれ示す。

【図6】 本発明のマイクロピペットの他の実施の形態（他の実施例）におけるノズル部における貫通孔の突起の状態を模式的に示す斜視図である。

【図7】 ノズル部における貫通孔の、漸減する断面積の変化の例を模式的に示す説明図である。

【図8】 本発明のマイクロピペットの他の実施の形態を模式的に示し、(a)は平面図、(b)は(a)のG-G断面図である。

【図9】 本発明のマイクロピペットの他の実施の形態を模式的に示し、(a)

は平面図、(b)は(a)のH-H断面図である。

【図10】 本発明のマイクロピペットの他の実施の形態を模式的に示し、(a)は平面図、(b)は(a)のI-I断面図である。

【図11】 本発明のマイクロピペットの他の実施の形態を模式的に示し、(a)は平面図、(b)は側面図、(c)は各複合体の平面拡大図、(d)は(c)の断面図である。

【図12】 本発明のマイクロピペットの他の実施の形態を模式的に示し、(a)は平面図、(b)は(a)のJ-J断面図である。

【図13】 本発明のマイクロピペットの他の実施の形態を模式的に示し、(a)は平面図、(b)は(a)のK-K断面図である。

【図14】 本発明のマイクロピペットの他の実施の形態を模式的に示し、(a)は平面図、(b)は(a)のL-L断面図である。

【図15】 本発明の分注装置の一の実施の形態を模式的に示す斜視図である。

【図16】 図15の分注装置に用いたマイクロピペットを模式的に示し、(a)は平面図、(b)は(a)のM-M断面図である。

【図17】 分注装置にカートリッジを取り付ける状況を模式的に示す斜視図である。

【符号の説明】

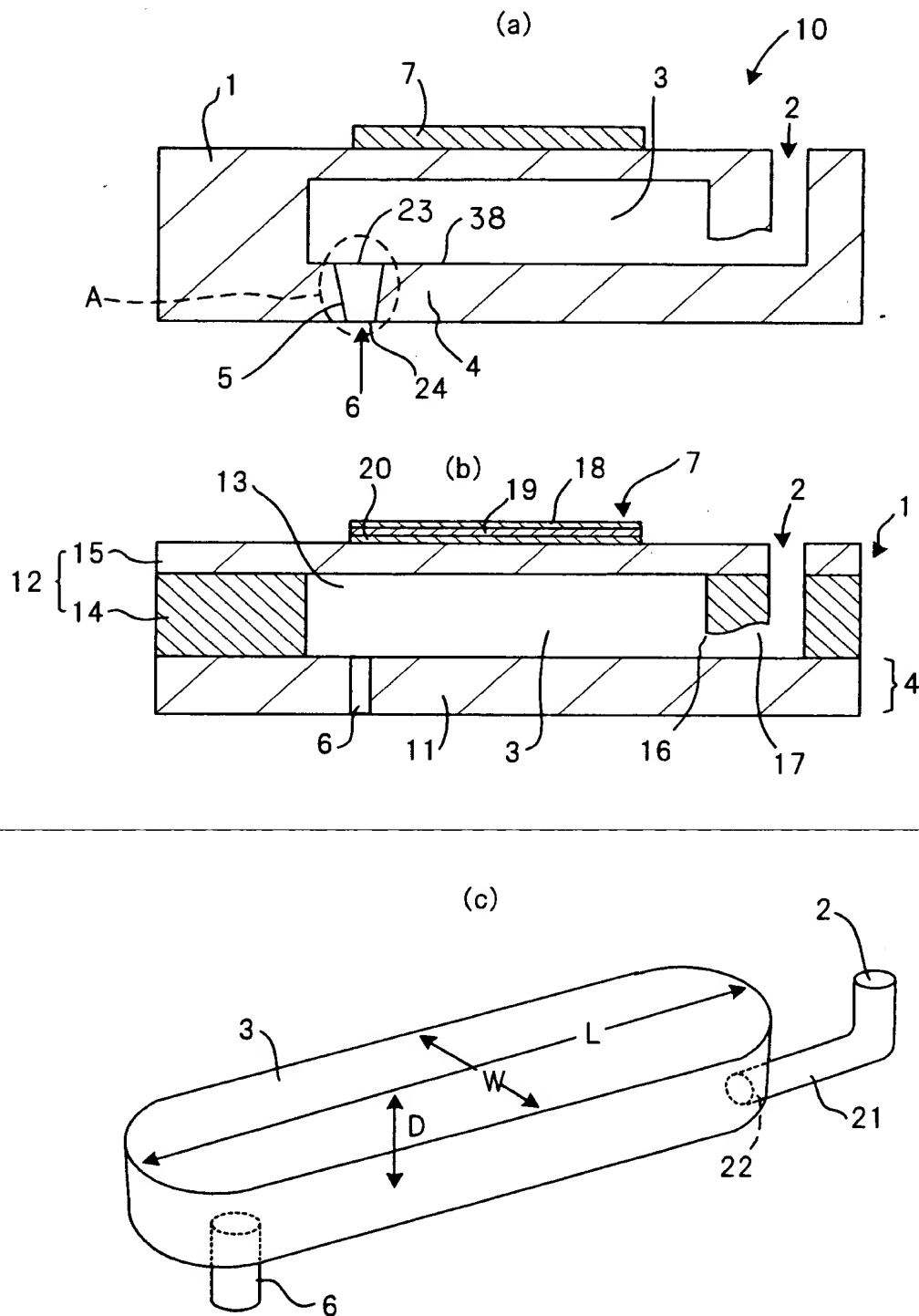
1…ピペット本体、1a～1c…ピペット部材、2…試料注入口、3…キャビティ、4…ノズル部、5…貫通孔、6…試料吐出口、7…圧電／電歪素子、8…突起(部)、10…マイクロピペット、11…ノズルプレート、12…ポンプ部、13…窓部、14…スペーサプレート、15…閉塞プレート、16…導入孔、17…連通路、18…上部電極、19…圧電／電歪膜、20…下部電極、21…連通路、22…導入孔、23…試料導入口端、24…試料排出口端、25…通常のピペット、26…連通路、27…導入孔、28…連通路、29…固定治具、30…押え治具、31…位置決めピン、32…固定板、33…連通路、34…ネジ、35…導入孔、36…連通路、37…接着剤、38…試料導入口端が形成された面、50a～50c…マイクロピペット、51a～51c…試料吐出口、52a～52c…試料注入口、53…異方飛行滴遮蔽板、55…分注装置、60…第1

特 2 0 0 0 - 3 1 5 6 4 3

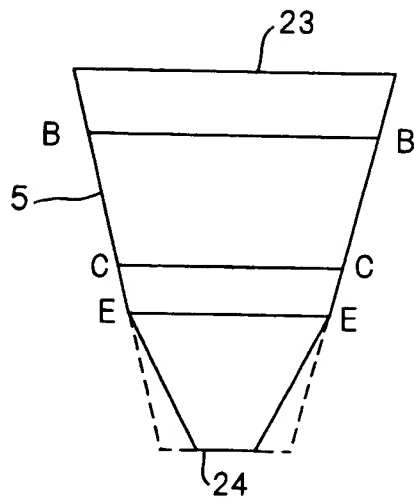
のカートリッジ。

【書類名】 図面

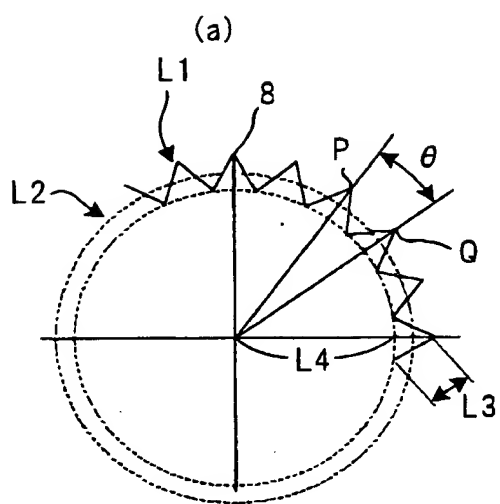
【図 1】



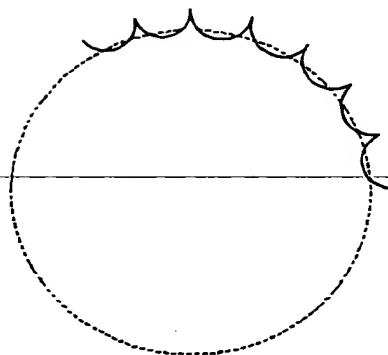
【図 2】



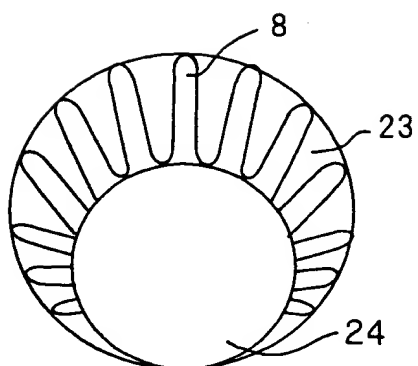
【図 3】



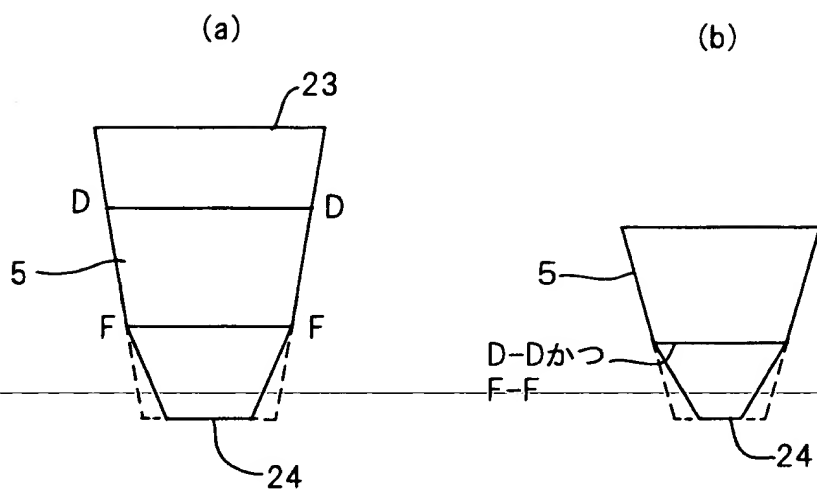
(b)



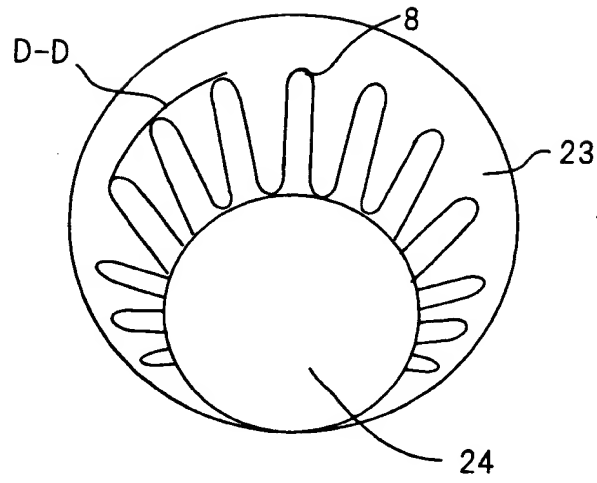
【図 4】



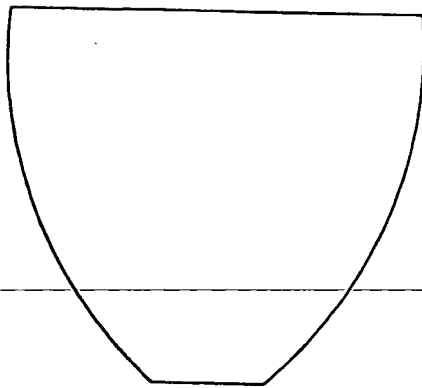
【図 5】



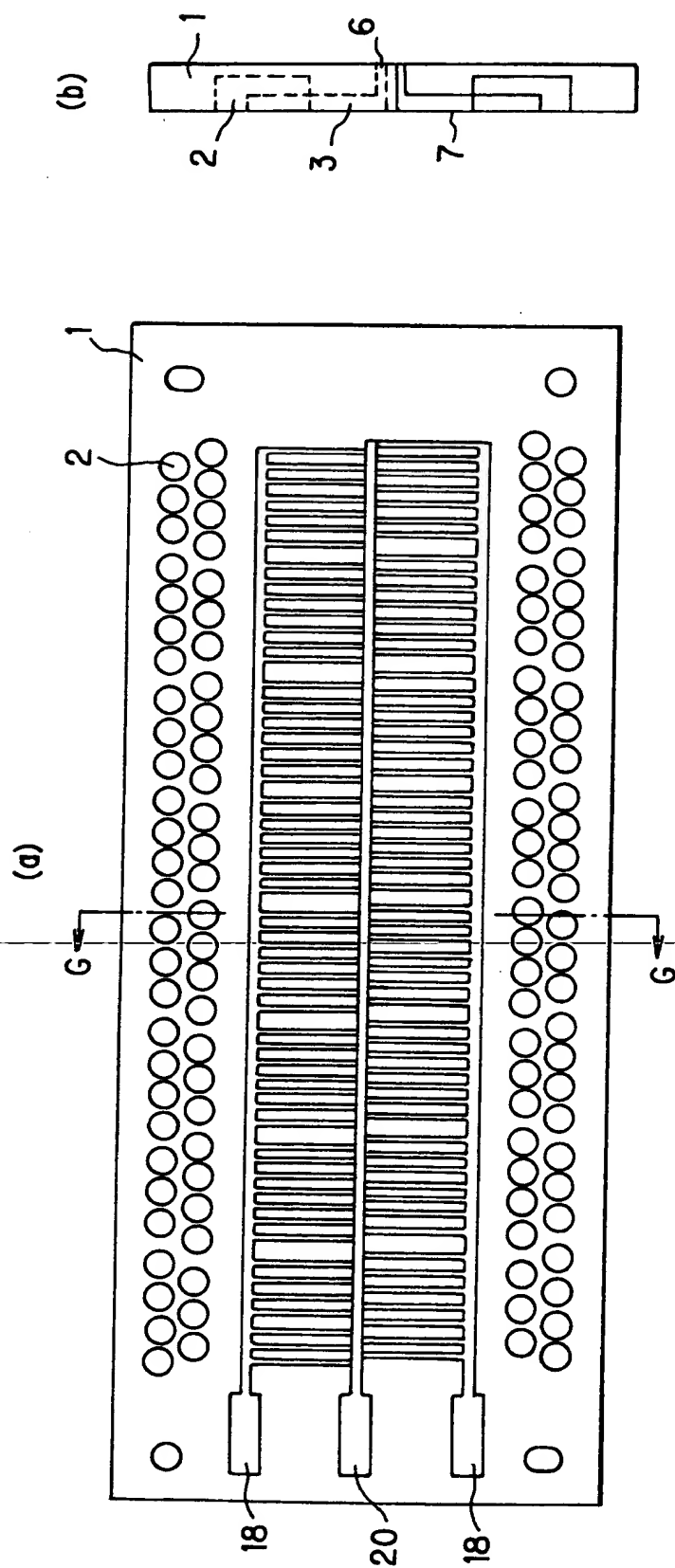
【図 6】



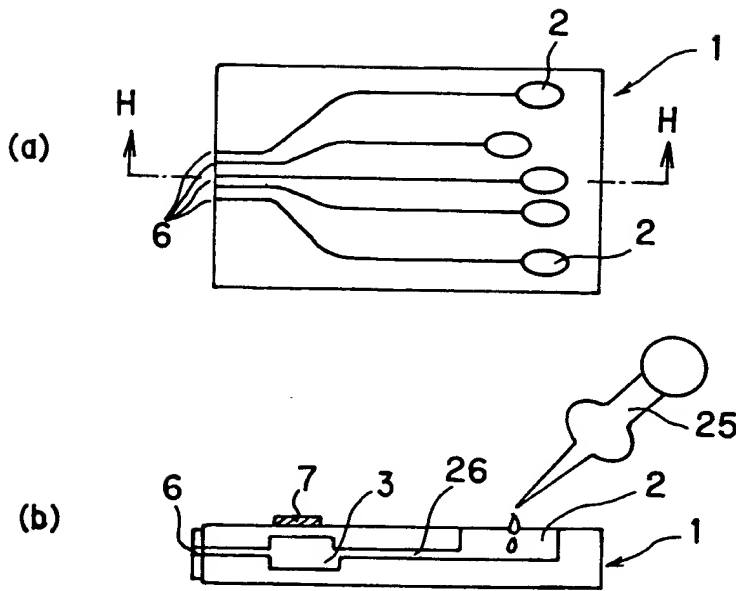
【図 7】



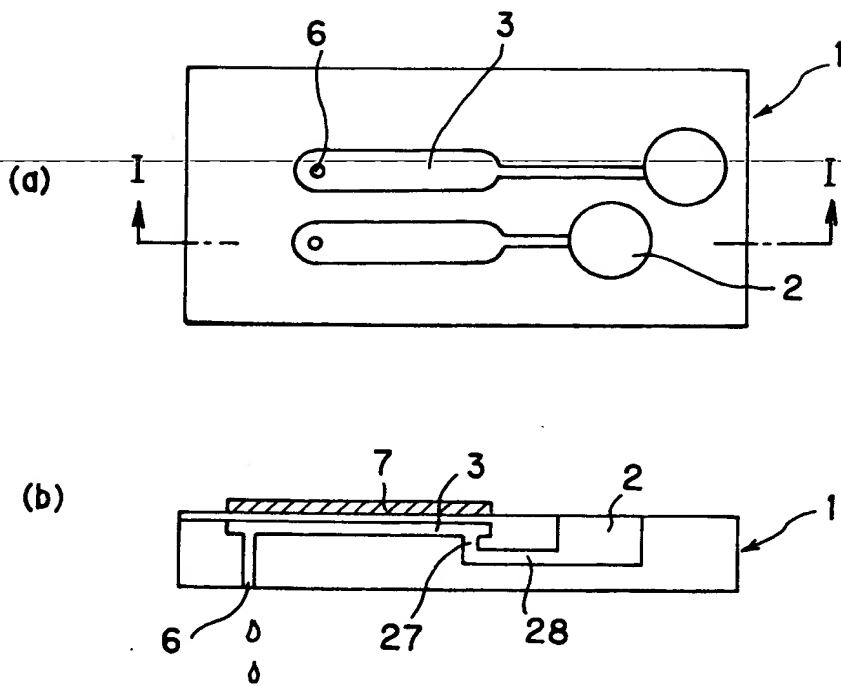
【図 8】



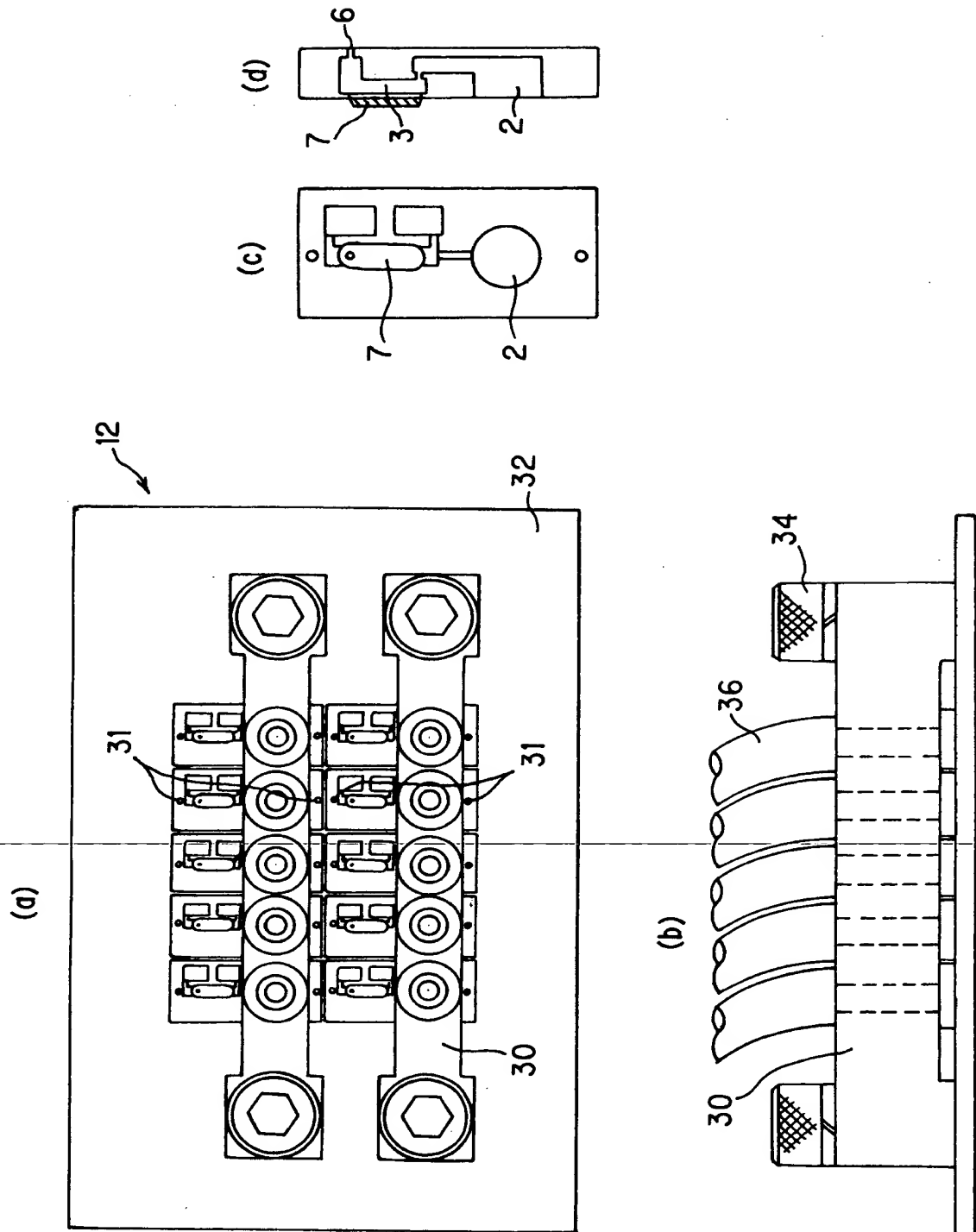
【図 9】



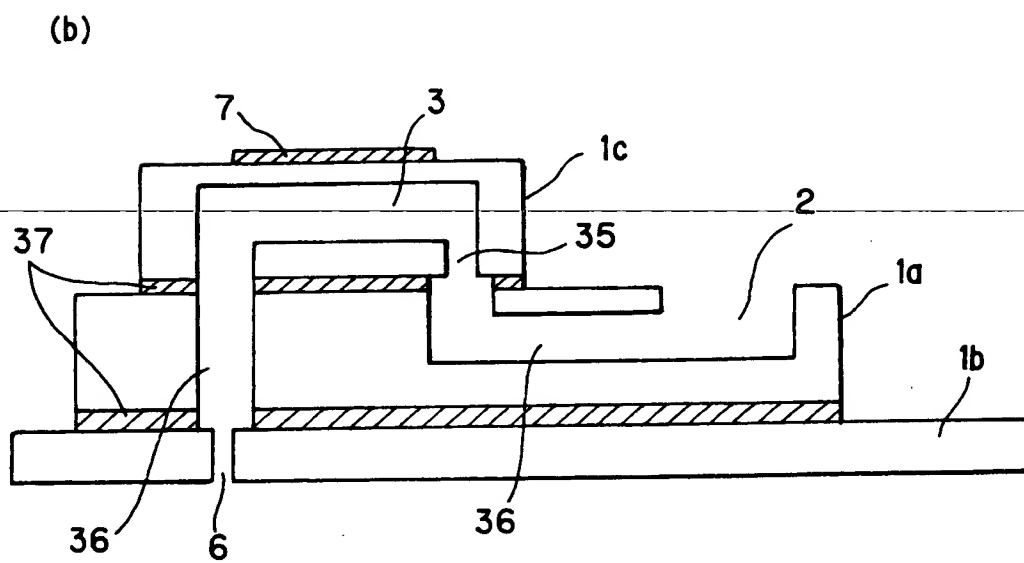
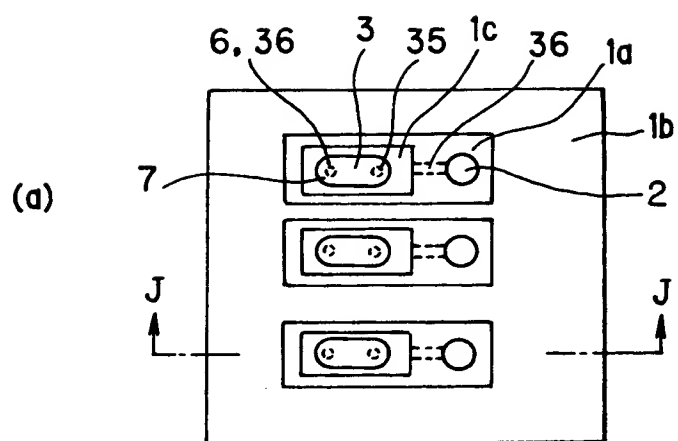
【図 1 0】



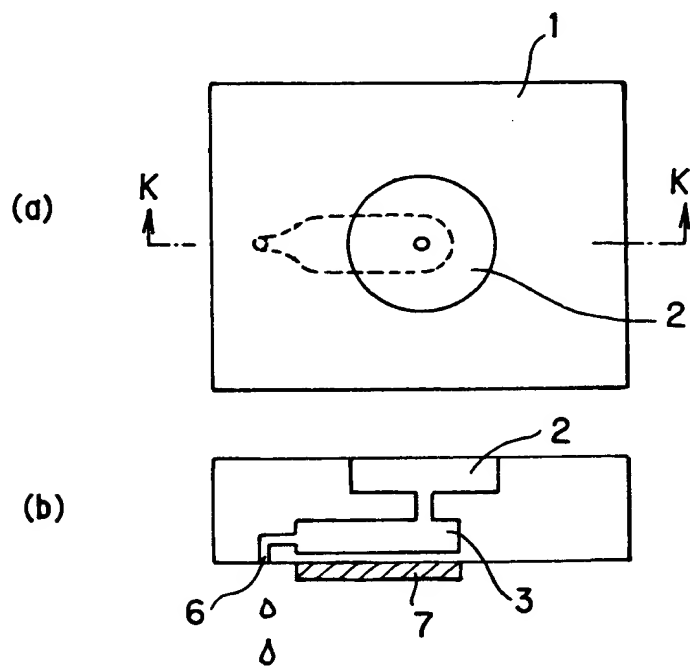
【図 1 1】



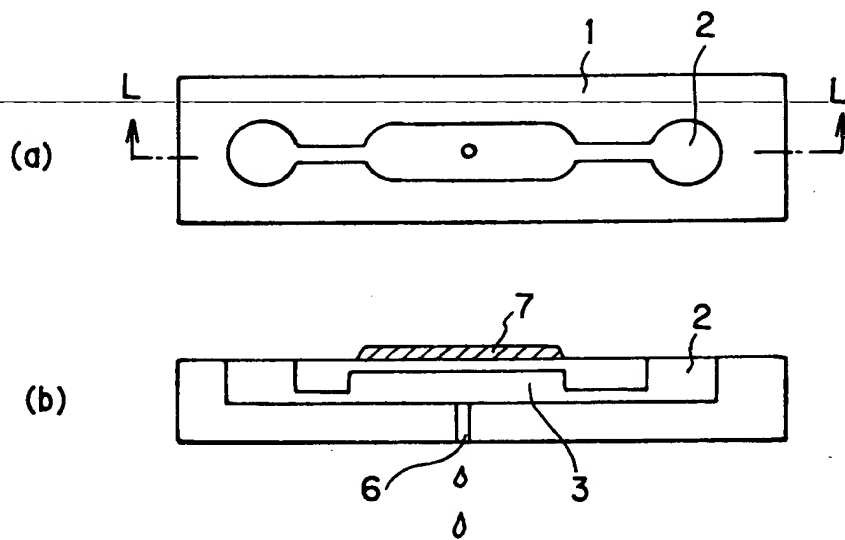
【図 1 2】



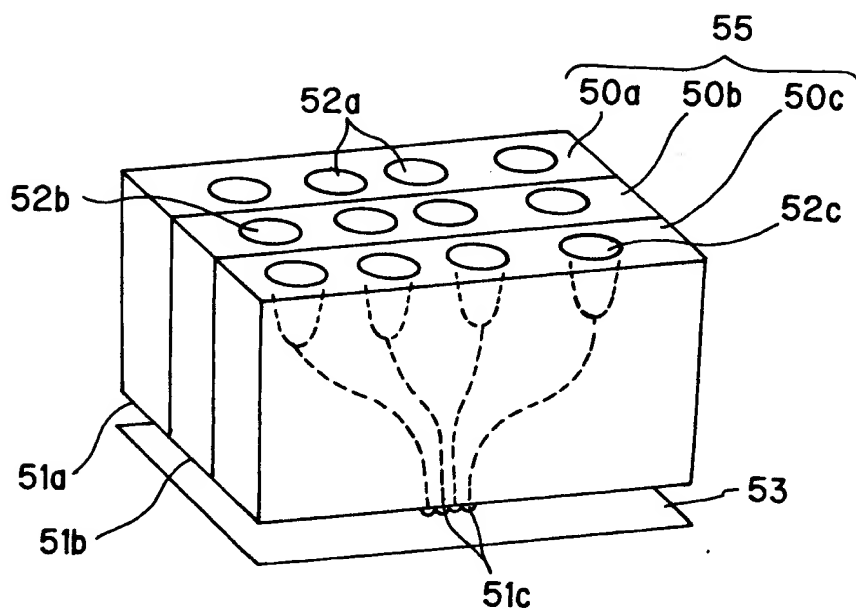
【図 1 3】



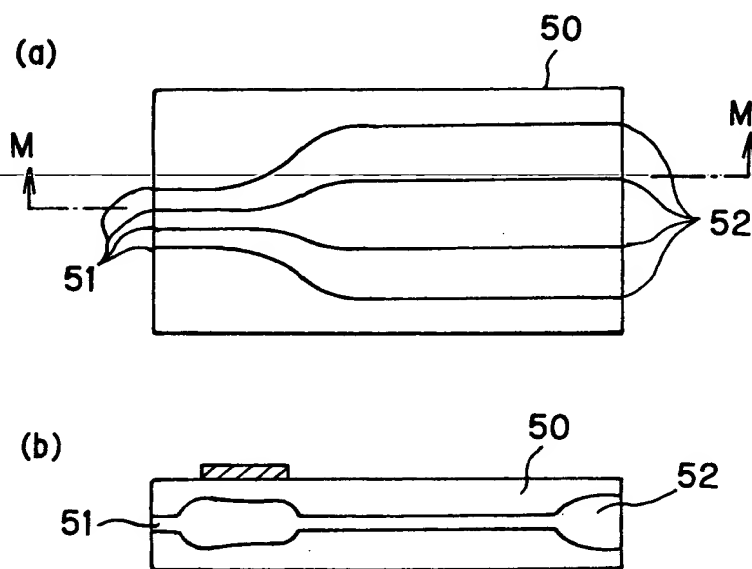
【図 1 4】



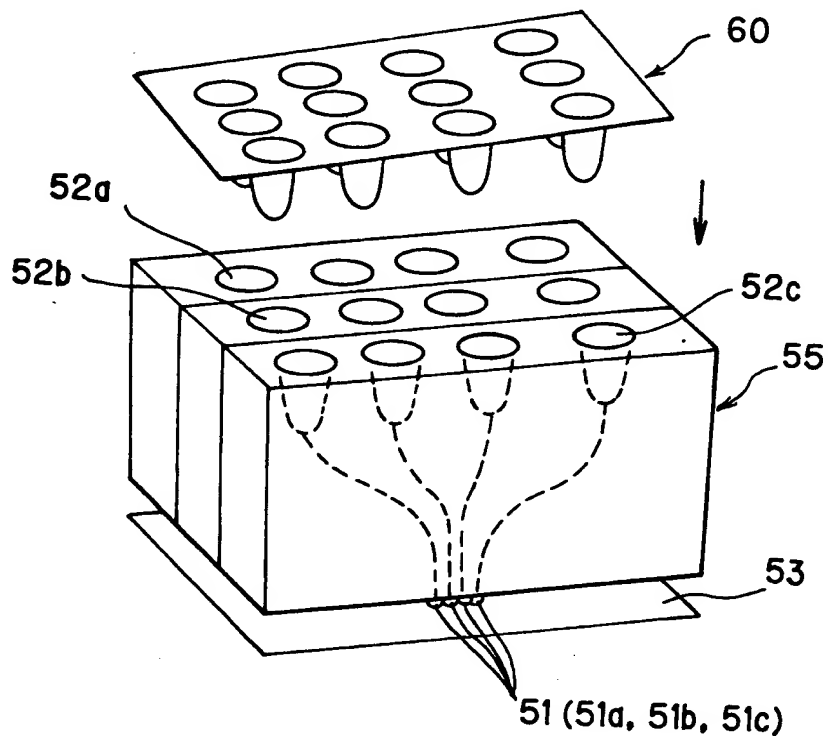
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 1 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 所定の基板上に微小体積の液滴を高密度に整列固定する作業を伴うDNAマイクロアレイ等のバイオチップの製造等の分野で好適に用いられる、微小スポットの形成作業の高精細化が可能で、得られる製品品質の向上を図ることができるマイクロピペット、分注装置及びバイオチップの製造方法を提供する。

【解決手段】 ピペット本体1に、ピペット本体1の外部から試料を注入する試料注入口2と、注入された試料を導入しかつ一時貯留し得るキャビティ3と、貯留された試料をノズル部4の貫通孔5を経由して外部に吐出する試料吐出口6とを形成してなるとともに、ピペット本体1の外面上に圧電／電歪素子7を設けてなり、圧電／電歪素子7の駆動によりキャビティ3内の体積を変化させ、キャビティ3内に貯留された試料の一定量を試料吐出口6から吐出させるマイクロピペット10であって、ノズル部4における貫通孔5の、軸方向に対して直角方向の断面形状が、中心から放射状に突き出た3個以上の突起を有するとともに、内角が鋭角と鈍角とを有する多角形状又は突起と突起とを曲線で結んだ王冠形状であり、また、その断面形状の面積（断面積）が、貫通孔5の試料導入口端23から試料排出口端24まで、略相似形を保持しつつ連続的に漸減するように変化してなることを特徴とするマイクロピペット。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004064]

1. 変更年月日 1990年 8月24日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号
氏 名 日本碍子株式会社